CRISPR/Cas 系统作为抗菌药的现状及展望

曾家伟　侯国锋 郑继平 杨诺 曾纪峰 郭桂英*

（海南大学，热带农林学院 海南 海口　570228）

摘 要：抗生素长期滥用导致了人体内菌群失调及细菌耐药性的产生，因此需要寻找新型、靶向抗菌方法来治疗耐药细菌的感染。近年来，CRISPR/Cas 系统的深入研究为设计特异性靶向耐药基因，定向清除耐药细菌的药物提供了新的思路。在此，本文介绍了 CRISPR/Cas 系统作为新型抗菌方法，通过靶向切割抗性质粒或细菌基因组以实现对耐药基因或病原菌的特异性清除，并对 CRISPR 抗菌药的不同类型核酸酶的选择，以及 CRISPR 递送系统的运载工具进行了评价。

关键词：细菌耐药性；特异性清除；CRISPR/Cas；运载工具

The progress of CRISPR/Cas system used as antimicrobials

ZENG Jia-wei　HOU Guo-feng　ZHENG Ji-ping　Yang Nou　Zeng Ji-feng　Guo Gui-ying*

(Hainan University, Tropical Agriculture and Forestry College, Haikou 570228)

Abstract： Antibiotics are used to arrest essential bacterial signaling and/or metabolic pathways, causing bacterial cell death. Overuse and misuse of antibiotics have led to dysbacteriosis and drug resistance. The application of CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas (CRISPR associated) systems provides a new method to kill the drug-resistant microbes specifically by designing programmable sequence-specific antimicrobials. Currently, the most efficient CRISPR/Cas systems are type I and type II as a novel antimicrobial tool in selective removal of bacterial pathogens. Bacteriophage has been developed as a delivery vehicle, but the membrane vesicles had more potential for transporting the CRISPR/Cas systems into the targeted resistant pathogen.

Keywords：Bacterial drug-resistance; Selective removal; CRISPR/Cas; Delivery vehicles

资助项目：国家自然科学基金(31460699);海南自然科学基金创新研究团队项目(2017CXTD005);海南自然科学基金面上项目(317071).

作者简介：曾家伟（1996-），男，学士，研究方向：微生物学 病原菌防治 E-mail：zengjiaweizjw@163.com

通讯作者：郭桂英（1973-），女，实验师研究方向：微生物遗传 E-mail：815827434@qq.com

0 引言

由于抗生素的滥用，越来越多的耐药细菌不断从医院或实验室中被分离出来，细菌耐药性逐渐成为一项严重的全球性健康问题。同时，传统抗生素通过阻断细菌新陈代谢途径或信号通路使细菌致死，但往往难以区分病原菌与有益微生物，导致了人体内的菌群失调及细菌耐药性的产生。根据英国政府 2014 年发布的一份报告中指出，如果没有寻找到新的抗菌方法，耐药细菌的感染预计到 2050 年将导致全球每年 1000 万人死亡[1]。 因此，迫切需要开发一种新型的抗菌方法来治疗耐药细菌的感染，并且特异性清除病原菌。

近些年来，一种人工核酸内切酶技术——CRISPR/Cas 的问世为细菌耐药性问题提供了全新的解决思路。CRISPR/Cas 系统是存在于大部分细菌和古细菌体内的一种用来抵抗外源遗传物质入侵，如噬菌体或外源质粒的获得性免疫系统，由 CRISPR 重复序列及其串联的 *cas* 基因组成[2]。根据其特异性的 *cas* 基因，CRISPR/Cas 系统可分为三类，即 I 型、II 型和 III型。三种类型都含有共同的基因 *cas*1 和 *cas*2，每种类型又都有各自的特定基因分别为：*cas*3、*cas*9 和 *cas*10。其中，II 型 CRISPR/Cas9 系统的开发凭借着其成本低廉，操作方便，效率高等优点，已逐渐成为继锌指核酸内切酶（ZFN）、类转录激活因子效应物核酸酶（TALEN）之后的第三代基因组编辑技术，被广泛地应用于基因组编辑领域。

基于 CRISPR/Cas 系统的基因编辑原理是切割 DNA 并定向修复。在真核细胞中，切割的 DNA 通过普遍存在的机制，例如：同源重组(Homologous-directed repair, HDR)或非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)被有效修复[3]。然而，在细菌中由于缺乏非同源末端连接机制[4]，细菌不能对 CRISPR/Cas 核酸酶所产生的 DNA 双链切割进行修复而死亡。因此，利用 CRISPR/Cas 系统靶向切割 DNA 造成细菌致死的能力，可将其发展成为一种高效、可特异性清除细菌的新型抗菌方法。

1 CRISPR/Cas 核酸酶选择

不同类型的 CRISPR/Cas 系统都是通过切割 DNA 或 RNA 来作为细菌抵抗外源遗传物质的免疫系统[5,6]。在这之中，I 型的 Cas3 与 II 型 Cas9 皆表现为清除病原菌的强有力核酸酶特性。II 型系统的 CRISPR/Cas9 是目前在基因组编辑领域最常用到的基因编辑工具，其基本结构包括三个序列区，即：tracrRNA（trans-activating crRNA，tracrRNA）序列区、Cas 序列区以及 CRISPR 序列区[2,3]。当系统发挥功能时 CRISPR 序列区就会转录形成 crRNA，然后与一段 tracrRNA 形成二元复合物成为 sgRNA(single guide RNA)。由于 sgRNA 上含有一段 20 nt 的间隔序列，该序列可与目标 DNA 靶序列碱基互补配对，进而引导 Cas9 核酸酶对靶序列进行双链剪切[7](图 1)。不过，由于 Cas9 核酸酶的这种 DNA 双链剪切原理，使 DNA 修复机制不仅存在于真核生物中，在个别原核生物体内也发现存在类似的修复机制。如 Cui 和 Bikard 报道了在大肠杆菌中通过额外的拷贝进行同源重组从而修复基因组 DNA 的现象[8]

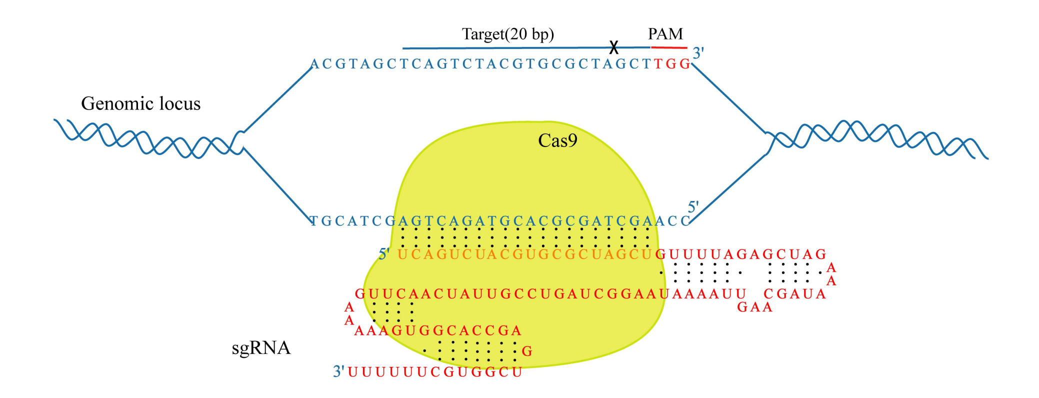


图 1 来自酿脓链球菌的 Cas9 核酸酶（黄色）依靠 sgRNA(红色)引导从而靶向目标 DNA。当 sgRNA 与位于 5'-NGG-3' 相邻基序（protospacer adjacent motif， PAM）上游的 DNA 靶序列（顶部链上的蓝色）碱基互补配对时，Cas9 核酸酶便在 PAM 序列上游的 3bp 处进行双链剪切。

Figure 1 The Cas9 nuclease from *S. pyogenes* (in yellow) is targeted to genomic DNA by a sgRNA. The guide sequence pairs with the DNA target (blue bar on top strand), directly upstream of a requisite 5′-NGG adjacent motif (PAM; red). Cas9 mediates a DSB ~3 bp upstream of the PAM (red triangle).

而在 I 型系统中，Cas3 同时具有 ssDNA 核酸外切酶和 3'-5'解旋酶活性[9,10]，在 3'-5'方向上切割并降解 DNA，从而导致靶序列上游的大部分 DNA 被破坏[11]。例如，存在于大肠杆菌基因组中的 CasI-E 系统需要 4-7 个蛋白质，即 Cas1-3 和 CasA-E(也称为 Cse1、Cse2、Cas7、Cas5 和 Cas6e) (图 2[12])。其作用机制是：CasA-E 与 crRNA 结合形成 Cascade 复合体，其中 Cas7 亚基构成该系统复合体的主干，crRNA 的 3'端与 Cas6e 亚基结合，而 5'端的结合包含一个 Cas7 亚基或 Cas5 或 Cse1。随后，Cascade 复合体通过 Cas3 的介导识别目标 DNA 序列，并且在 PAM 位点 5'末端的 7 nt 序列处切割目标 DNA 序列，最终导致 DNA 降解。Gomaa 等人[13]的研究表明大肠杆菌 I-E 系统作为可编程抗菌药的实用性，在内源和异源表达时表现出一定的活性，并且可对菌株间共有的基因组序列进行多种菌种同时清除。 此外，Yosef 等人[14]也采取了类似的方法来清除大肠杆菌含抗生素抗性的质粒，提高了其对抗生素敏感性进而杀死大肠杆菌。相比于目前常用的 II 型系统 CRISPR/Cas9, I 型系统脱靶率更低，并且其可持续降解靶序列上游 DNA 片段的能力可造成 DNA 几乎没有被修复的可能性。

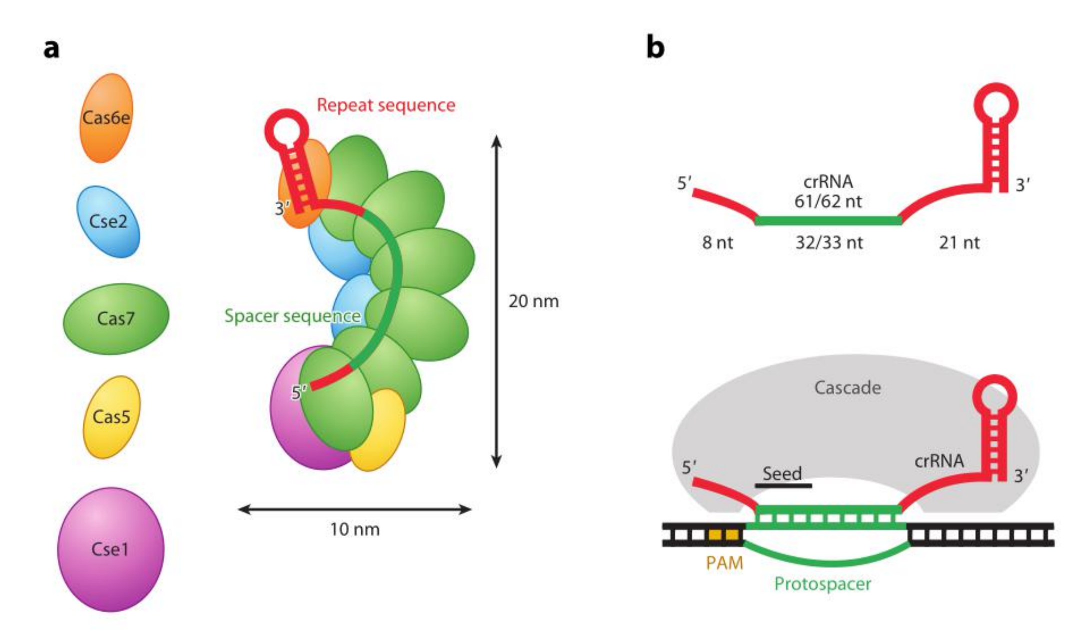


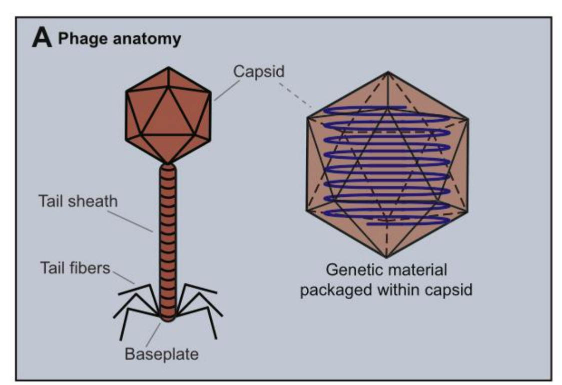
图 2 (a) Cascade 复合体结构。(b) Cascade 识别目标 DNA 序列示意图[12]。

Figure 2 (a) Cascade's complex structure. (b) Schematic diagram of Cascade identifying the target DNA sequence [12]

2 CRISPR/Cas 系统的运载工具

2.1 噬菌体作为 CRISPR/Cas 系统运载体的应用

就目前来说，CRISPR 技术的发展对于高效且特异性清除病原菌面临的最重要挑战是如何有效地将 CRISPR/Cas 系统向不同的细菌运送，这就需要寻找一种高效的运载工具。最常用到的运载工具是噬菌体[16,22]，其通过尾部的尾纤维蛋白与宿主细菌表面相应分子相结合。尾丝和相应受体结合后起到两个功能：固着噬菌体以及引起尾丝和尾鞘蛋白构象改变，使得尾管得以接触细菌表面。尾管具有溶菌酶活性，可降解细菌细胞壁并插入细菌体内，同时收缩的尾鞘得以将核酸注射入细菌体内[14]。例如，Citorik RJ 等[16] 利用噬菌粒转导来传递 CRISPR/Cas9 系统。该系统包含有靶向肠出血性大肠杆菌体内质粒上的耐药性基因序列，并最终有效地从细菌中去除了这些质粒，使细菌又恢复对抗生素的敏感性；Chen J 等[22]利用噬菌粒介导的 CRISPR/Cas9 对含有毒力基因的金黄色葡萄球菌进行序列特异性清除。并且这种方法能够有效去除携带抗性基因的质粒，从而使细菌对抗生素重新敏感化。当使用噬菌体作为运载工具时，常用的有两种整合 CRISPR/Cas 系统的方式：将系统整合进噬菌粒（phagemid）或者整合进噬菌体基因组内（图 3[17]）。噬菌粒是同时包含有质粒复制原点和抗生素抗性选择标记的丝状噬菌体衍生载体。其几乎不会编码任何影响细胞生理的额外噬菌体成分，只是含有丝状体噬菌体的间隔区(intragenic region，IG)和衣壳蛋白编码序列[18]。当整合进基因组中时要比整合噬菌粒更加繁琐和费时，但相较于噬菌粒，噬菌体基因组可避免细菌体内对外源 DNA 的降解与修饰。



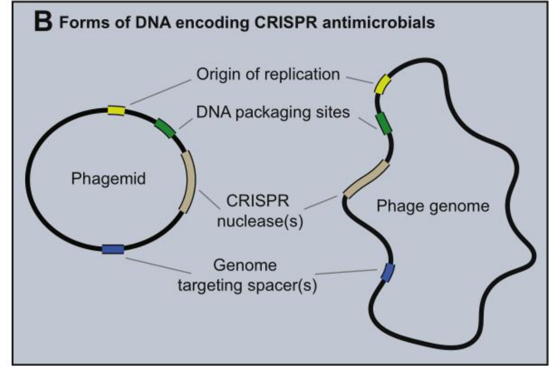


图 3　将 CRISPR/Cas 系统整合到噬菌粒或噬菌体基因组中，用于噬菌体的包装和细胞内传递[17]。

Figure 3　The CRISPR/Cas system is integrated into the phagemid or phage genome for packaging and intracellular delivery[17]

除此之外，噬菌体用作 CRISPR/Cas 系统最大的障碍就是其不具有宿主广谱性。常用的噬菌体仅仅只能吸附一种或一类细菌，这种狭窄的吸附范围对利用噬菌体作为通用 CRISPR/Cas 系统运载工具是一个很大的挑战[19]。针对这个问题，研究人员也在探索一些解决方案。一种方法是使用“鸡尾酒”(cocktail)疗法，即多种噬菌体组合在一起,以扩大对更多的细菌侵染[24,25]。理论上，只要“鸡尾酒”疗法包含的噬菌体种类越多，其覆盖宿主的范围就会越大，进而造成对多种病原菌的有效杀伤。Żaczek M 等[25]利用噬菌体鸡尾酒疗法对 20 例链球菌感染受试者进行治疗，结果显示其疗效得到显著提高。另一种方法是通过改变或交换尾部负责与细菌细胞表面结合的纤维蛋白来拓宽其广谱性。Ando H 等[20]开发了一种通过交换尾纤维基因，从而改变了 DNA 的传递范围的噬菌体，该噬菌体可以容纳相关噬菌体的尾纤维蛋白，从而使其能够传递给不同的肠道细菌。Yosef 等[21] 开发了展示各种噬菌体尾部/尾部纤维蛋白的杂交颗粒用于 T7 噬菌体转导 DNA 的宿主范围。这些模块化颗粒被编程为将 DNA 包装并转导到限制 T7 噬菌体繁殖的宿主中。同时还开发了一种创新的可普遍使用的平台，该平台能够通过人造尾高效转导 DNA 来增强 DNA 转移到新的宿主。

在体内试验中，已有相关文献表明利用噬菌体作为 CRISPR/Cas 系统的运载体时，能够发挥靶向清除临床相关病原菌的作用[15,16,22]。然而，就目前来说基于噬菌体的递送系统在实际的临床治疗中还尚存一些缺陷，例如在体内试验时较低的递送效率、狭窄的宿主范围以及潜在的通过广义转导转移毒力基因的可能性[23]。针对这些问题，Park J Y 等[15]通过将 CRISPR/Cas9 系统整合到温和噬菌体基因组中，一定程度上克服了基于噬菌体递送的这些缺点，提高了向靶细胞传递的效率。并且通过补充噬菌体的尾纤维蛋白来扩大宿主特异性，从宿主菌株中去除毒力因子基因以防止噬菌体裂解物中有害细菌产物的污染以及避免了通过广义转导毒力基因的扩散。因此，利用噬菌体携带 CRISPR/Cas 系统作为抗菌药的功效在临床治疗的应用中仍然具有较大的潜力。

2.2 利用细胞外囊泡运载 CRISPR/Cas 系统

活细胞产生的胞外囊泡按照分泌它们的细胞种类不同而有不同的命名，一般被称为膜囊泡（membrane vesicles，MVs）或胞外囊泡（extracellular vesicles, EVs）。 由革兰氏阴性菌分泌的囊泡被称为外膜囊泡（outer membrane vesicles, OMVs）；由革兰氏阳性菌分泌的囊泡被称为膜泡（membrane vesicles，MVs）；而由真核细胞分泌的囊泡则称为外泌体(exosome)。尽管最初被认为是细胞裂解而随机产生的，但现在已经确定 MVs 通过活细胞分泌产生[26,27]，由脂质双分子层包裹而形成的球型囊泡，其分子直径在 10-500 nm 之间。其可携带细胞的多种成分，如脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）、毒素、胆固醇、鞘磷脂、以及核酸等物质[28]。

目前，尽管人们对细胞如何结合与摄取 MVs 的机制尚不明确，似乎不同的摄取途径与受体细胞的种类不同有关[33]，但利用细胞具有分泌和摄取 MVs 的生物学特性，即以 MVs

作为新型的疫苗传递载体，通过 MVs 与细胞表面配体的相互接触，从而将效应分子递送至目的细胞，完成细胞之间的物质交换[32,33]（图 4），已受到研究者们的广泛关注[29-31]。例如 2017 年 Kim 等[34]将癌细胞分泌的 MVs 作为 CRISPR/Cas9 系统的载体，实现了体内靶向清除癌细胞。本实验室[43]利用大肠杆菌分泌的外膜囊泡作为靶向无乳链球菌的 CRISPR/Cas9 系统的运载体，以混合培养的方式实现了低效特异地清除无乳链球菌。

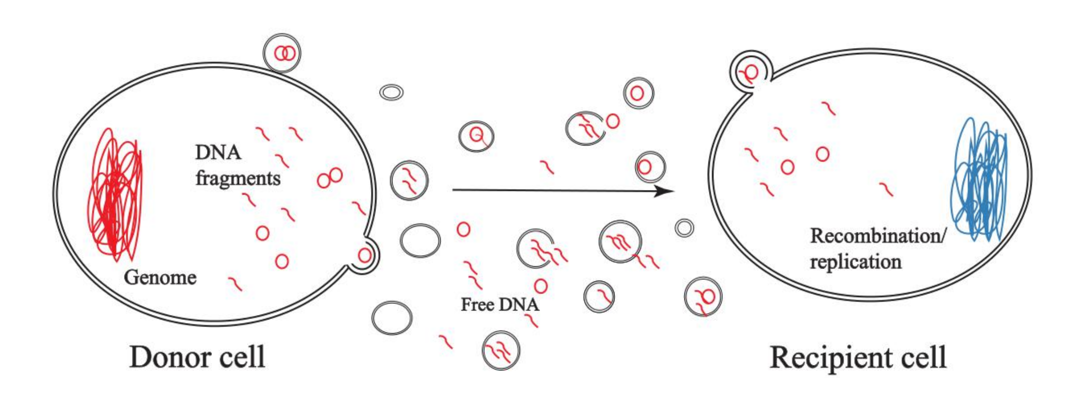


图 4 膜囊泡(MVs)介导的 HGT 把核酸分子包裹在腔内由供体细胞分泌释放，当与受体细胞表面配体相接触时，可将核酸递送至受体细胞完成 HGT 过程[27]。（参考文献[27]进行修改）

Figure 4 Membrane-vesicle (MV) mediated horizontal gene transfer from a donor to a recipient cell. Membrane vesicles (10–500 nm in diameter) may contain nucleic acids in the lumen or bound to the surface. Upon lysis DNA in the lumen will be sensitive to nucleases. (partially adapted from the reference [27])

表 1 MVs 介导的细菌之间水平基因转移[27]

Table 1 membrane vesicles mediated HGT in prokaryotes[27]

	遗传物质 Genetic material	供体细胞 Donor cells	受体细胞 Recipient cells	参考文献 Reference
革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria	质粒 DNA Plasmid DNA	淋病奈瑟氏菌 *Neisseria gonorrhoeae*	淋病奈瑟氏菌 *N. gonorrhoeae*	[35]
	质粒与噬菌体 DNA Plasmid and phage DNA	大肠杆菌 *E. coli*	大肠杆菌 *E. coli*	[36]
	噬菌体 DNA Phage DNA	大肠杆菌 *E. coli*	沙门氏菌 *Salmonella enterica*	[36]
	质粒 DNA Plasmid and	鲍曼不动杆菌 *Acinetobacter baumannii*	鲍曼不动杆菌 *A. baumannii*	[37]
	质粒 DNA Plasmid and	不动杆菌 *Acinetobacter baylyi*	不动杆菌和大肠杆菌 *A. baylyi and E. coli*	[33]
	基因组 Chromosomal DNA	牙龈卟啉单胞菌 *Porphyromonas gingivalis*	牙龈卟啉单胞菌 *P. gingivalis*	[38]
	基因组与质粒 DNA Chromosomal DNA and plasmid DNA	嗜热栖热菌和栖热菌 *Scotoductus T. thermophiles and Thermus scotoductus*	嗜热栖热菌 *T. thermophilus*	[39]
革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria	基因组 Chromosomal DNA	瘤胃球菌和白色瘤胃球菌 *Ruminococcus sp. and Ruminococcus albus*	瘤胃球菌 *Ruminococcus sp.*	[40]

当前将 MVs 用于携带 CRISPR/Cas 系统靶向清除病原菌的研究较少，原因可能与细菌在自然条件下分泌 MVs 量低有关[32]。同时革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌相比，由于其具有比革兰氏阴性菌更厚的细胞壁而进一步增加了膜泡的融合难度，从而产生更低的膜泡传递效率[27]。不过，已有研究证实细菌的水平基因转移（horizontal gene transfer，HGT）与 MVs 密切相关（表 1[27]），即 HGT 的发生是以细菌分泌的 MVs 为运载体而传递的。因此，从理论上，利用细菌分泌的 MVs，通过与病原菌的非特异性融合，是可以将 CRISPR/Cas 系统导入病原菌菌体，进而对其靶向清除。为验证这一推论，我们实验室构建了具有靶向剪切无乳

链球菌毒力因子 CAMP 编码基因 *cfb* 的 CRISPR/Cas9 穿梭质粒，然后以无靶向剪切作用的原始穿梭质粒为对照，以大肠杆菌 X6097 为供体细胞，通过与罗非鱼源高致病性无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的混合培养和无乳链球菌菌落计数分析，检验质粒能否经 X6097 传递而消除无乳链球菌。结果显示，在具有特异性筛选无乳链球菌和质粒抗性的平板上没有产生菌落，而对照实验平板上产生了少数菌落，对这些菌落的 PCR 分析皆证实了穿梭质粒的存在。同时，对混合培养上清的 MVs 制备和 PCR 分析也证实了在 MVs 中确实存在有穿梭质粒，从而证实大肠杆菌能够将所含质粒低效率地转入无乳链球菌体内并特异性清除无乳链球菌，MVs 在该质粒转化过程中发挥着关键作用。该研究为利用 MVs 为递送载体用于递送 CRISPR/Cas 系统进行特异性清除病原菌提供了事实依据[43]。

3 未来发展及展望

CRISPR/Cas 抗菌药由于其对病原菌序列特异性清除的优点，而成为一种十分有潜力替代传统抗生素的新型抗菌武器。但也应注意，CRISPR/Cas 系统也有可能对体内有益微生物产生一定的杀伤作用，如 Cas 核酸酶在体内的高表达易造成对非靶 DNA 序列的切割[7]。在此，我们也提出一种设想，在仅仅转入含细菌特异性靶点的 sgRNA 序列的情况下，利用细菌本身 CRISPR/Cas 系统对其自身序列进行切割作用，进而杀死细菌。该方法可以避免 Cas 核酸酶对有益微生物甚至人体细胞的非靶向切割，并简化了转入的质粒，降低了操作难度。然而，该方法仅限于具有功能活性的 CRISPR/Cas 系统的细菌，并且对 CRISPR/Cas 位点的表达和遗传稳定性很敏感。

同时，基于噬菌体和膜泡等递送系统的有效性和安全性方面尚有不足。尽管目前除上述两种递送系统外，还有其他运载工具被开发出来，如 Kang 等人[41] 开发出了基于聚合物的纳米颗粒，将 Cas9-sgRNA 核糖核蛋白复合物递送至细菌细胞，但其效率也十分低，终究不能达到病原菌防治的地步。因此，CRISPR/Cas 抗菌药物的治疗从实验室走向动物模型再到人体应用仍然还有很长的路要走。不过，利用 CRISPR/Cas 系统作为抗菌药的思路是十分新颖也十分有潜力的。例如，可以设计含有多种病原菌特异性靶点的 CRISPR/Cas 质粒[42]，再转入乳酸菌等益生菌体内。当人体食用后，乳酸菌可分泌携带有 CRISPR/Cas 质粒的膜泡，与肠道菌群进行非特异性融合并清除病原菌，进而调节肠道菌群。尽管利用膜泡作为运载工具的传递效率低[29,43]，但长期存在于肠道的益生菌将会对病原菌起到一定防治作用，降低人体感染病原菌的几率。相信在未来高效且便捷的递送系统将会被开发出来，同时 CRISPR/Cas 系统自身脱靶性也会得到圆满解决，从而推动该系统成为替代传统抗生素的新型抗菌武器。

参 考 文 献

[1] O'Neill J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations[J]. The Review on Antimicrobial Resistance, 2014, 20.

[2] Sander J D, Joung J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes[J]. Nature biotechnology, 2014, 32(4): 347.

[3] 徐坤. 源于嗜热链球菌的真核 CRISPR/Cas9 系统的建立, 优化及其应用研究[D]. 西北农林科技大学, 2015.

Establishment, optimization and application of *streptomyces thermophilus* CRISPR/Cas9 system [D]. Northwest A&F University, 2015.

[4] Staals R H J, Jackson S A, Biswas A, et al. Interference-driven spacer acquisition is dominant over naive and primed adaptation in a native CRISPR–Cas system[J]. Nature communications, 2016, 7: 12853.

[5] Koonin E V, Makarova K S, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. Current opinion in microbiology, 2017, 37: 67-78.

[6] Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(11): 722.

[7] Jiang Y, Qian F, Yang J, Liu Y, Dong F, Xu C, Sun B, Chen B, Xu X, Li Y, et al.: CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. Nat Commun 2017, 8:15179

[8] Cui L, Bikard D. Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli*[J]. Nucleic acids research, 2016, 44(9): 4243-4251.

[9] Beloglazova N, Petit P, Flick R, et al. Structure and activity of the Cas3 HD nuclease MJ0384, an effector enzyme of the CRISPR interference[J]. The EMBO journal, 2011, 30(22): 4616-4627.

[10] Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, et al. Cas3 is a single‐stranded DNA nuclease and ATP‐dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system[J]. The EMBO journal, 2011, 30(7): 1335-1342.

[11] Caliando B J, Voigt C A. Targeted DNA degradation using a CRISPR device stably carried in the host genome[J]. Nature communications, 2015, 6: 6989.

[12] Westra E R, Swarts D C, Staals R H J, et al. The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity[J]. Annual review of genetics, 2012, 46: 311-339.

[13] Gomaa A A, Klumpe H E, Luo M L, et al. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems[J]. MBio, 2014, 5(1): e00928-13.

[14] Yosef I, Manor M, Kiro R, et al. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2015, 112(23): 7267-7272.

[15] Park J Y, Moon B Y, Park J W, et al. Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*[J]. Scientific reports, 2017, 7: 44929.

[16] Citorik RJ, Mimee M, Lu TK: Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. Nat Biotechnol 2014, 32:1141–1145.

[17] Fagen J R, Collias D, Singh A K, et al. Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials[J]. 2017, 4.

[18] 张文倩,李华琴.噬菌粒载体在噬菌体展示中的应用和研究进展[J].生物技术,2014,24(01):96-100.

Zhang Wen-qian, Li Hua-qin. Application and progress of phagemid vector in phage display[J]. Biotechnology, 2014,24(01):96-100

[19] Denyes J M, Dunne M, Steiner S, et al. Modified bacteriophage S16 long tail fiber proteins for rapid and specific immobilization and detection of Salmonella cells[J]. Applied and environmental microbiology, 2017, 83(12): e00277-17.

[20] Ando H, Lemire S, Pires DP, Lu TK: Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing. Cell Syst 2015, 1:187–196.

[21] Yosef I, Goren MG, Globus R, Molshanski-Mor S, Qimron U: Extending the host range of bacteriophage particles for DNA transduction. Mol Cell 2017, 66:721–728. e3.

[22] Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. Nat Biotechnol. 2014; 32(11):1146–50.

[23] Chen J, Novick R P. Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes[J]. science, 2009, 323(5910): 139-141.

[24] Yen M, Cairns LS, Camilli A: A cocktail of three virulent bacteriophages prevents Vibrio cholerae infection in animal models. Nat Commun 2017, 8:14187.

[25] Żaczek M, Łusiak-Szelachowska M, Jończyk-Matysiak E, et al. Antibody production in response to staphylococcal MS-1 phage cocktail in patients undergoing phage therapy[J]. Frontiers in microbiology, 2016, 7: 1681.

[26] Brown L, Wolf J M, Prados-Rosales R, et al. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(10): 620.

[27] Domingues S, Nielsen K M. Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes[J]. Current opinion in microbiology, 2017, 38: 16-21.

[28] Gerritzen M J H, Martens D E, Wijffels R H, et al. Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform[J]. Biotechnology advances, 2017, 35(5): 565-574.

[29] 舒聪妍,王世杰,高福兰,等. 大肠埃希菌外膜囊泡作为新型外源质粒递送载体的研究[J/OL].中国生物制品学杂志:1-5

Shu Cong yan, Wang Shi jie, Gao Fu lan, et al. *E. coli* outer membrane vesicles as a novel exogenous plasmid delivery vector[J/OL]. Chin

J Biologicals: 1-5

[30] Andaloussi S E L, Mäger I, Breakefield X O, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities[J]. Nature reviews Drug discovery, 2013, 12(5): 347.

[31] 李思迪,侯信,亓洪昭,等. 外泌体:为高效药物投递策略提供天然的内源性纳米载体[J].化学进展,2016,28(Z2):353-362.

Li Sidi, Hou Xin, Qi Hongzhao, et al. Exosomes: Provide naturally occurring endogenous nanocarriers for effective drug delivery strategies[J]. Progress In Chemistry, 2016,28(Z2):353-362.

[32] Schwechheimer C, Kuehn M J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions[J]. Nature reviews microbiology, 2015, 13(10): 605.

[33] Fulsundar S, Harms K, Flaten G E, et al. Gene transfer potential of outer membrane vesicles of Acinetobacter baylyi and effects of stress on vesiculation[J]. Applied and environmental microbiology, 2014, 80(11): 3469-3483.

[34] Kim S M, Yang Y, Oh S J, et al. Cancer-derived exosomes as a delivery platform of CRISPR/Cas9 confer cancer cell tropism-dependent targeting[J]. Journal of Controlled Release, 2017, 266: 8-16.

[35] Dorward D W, Garon C F, Judd R C. Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Journal of bacteriology, 1989, 171(5): 2499-2505.

[36] Yaron S, Kolling G L, Simon L, et al. Vesicle-Mediated Transfer of Virulence Genes from *Escherichia coli* O157: H7 to Other Enteric Bacteria[J]. Applied and environmental microbiology, 2000, 66(10): 4414-4420.

[37] Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2011, 55(7): 3084-3090.

[38] Ho M H, Chen C H, Goodwin J S, et al. Functional advantages of *Porphyromonas gingivalis* vesicles[J]. PloS one, 2015, 10(4): e0123448.

[39] Blesa A, Berenguer J. Contribution of vesicle-protected extracellular DNA to horizontal gene transfer in *Thermus* spp[J]. Int Microbiol, 2015, 18(3): 177-187.

[40] Klieve A V, Yokoyama M T, Forster R J, et al. Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic *Ruminococcus* spp. of ruminal origin[J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 71(8): 4248-4253.

[41] Kang YK, Kwon K, Ryu JS, et al. Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance. Bioconjugate Chem 2017, 28:957–967.

[42] Guo L, Xu K, Liu Z, et al. Assembling the *Streptococcus thermophilus* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) array for multiplex DNA targeting[J]. Analytical biochemistry, 2015, 478: 131-133.

[43] 侯国锋,曾家伟,羊熙春,等. 细菌膜泡与 CRISPR 联合消除无乳链球菌的研究[J/OL].热带生物学报:1-7

Hou Guo-feng, Zeng Jia-wei, Yang Xi-chun, et al. Study on the combination of OMVs and CRISPR to kill GBS[J/OL]. Journal of Tropical Biology: 1-7